

## Streszczenie

Ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR) stanowią przyjazną dla środowiska alternatywę ograniczającą stosowanie chemicznych nawozów i fungicydów. PGPR poprawiają wzrost roślin poprzez wydzielanie fitohormonów, rozpuszczanie fosforanów, wiązanie azotu, zwiększanie wchłaniania składników odżywczych i działanie jako środki biokontroli patogenów. Skuteczność inokulacji PGPR jest powiązana z ich zdolnością kolonizacji korzenia, a także przetrwania w obecności rodzimych zbiorowisk bakterii i grzybów w ryzosferze.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była charakterystyka i identyfikacja bakterii wyizolowanych z ryzosfery korzeni rzepaku uprawianego na dwóch gospodarstwach wiejskich położonych w Górsku w województwie kujawsko-pomorskim i w Ostródzie w województwie warmińsko-mazurskim, ocena wpływu ryzobakterii na poprawę wzrostu i rozwoju rzepaku, poszukiwanie genów przyczyniających się do promowania wzrostu roślin i biokontroli patogenów roślinnych, a także określenie wpływu inokulacji ryzosfery PGPR na liczebność mikroorganizmów związanych z obiegiem azotu oraz bioróżnorodność rodzimych zbiorowisk bakteryjnych i grzybowych.

W badaniach wstępnych, przeprowadzono analizę określenia liczebności ryzobakterii hodowlanych z różnych faz wzrostu rzepaku (wegetatywnej, kwitnienia i dojrzewania), uprawianego w Górsku i w Ostródzie. Badania wykazały złożoną dynamikę zbiorowisk drobnoustrojów, ujawniając różnice w liczebności hodowlanych ryzobakterii na różnych etapach wzrostu rzepaku. W przypadku ryzosfery rzepaku pobranego z Górsk, populacja hodowlanych ryzobakterii była najwyższa w fazie wegetatywnej, zmniejszała się w fazie kwitnienia, a następnie zwiększała się w fazie dojrzałości rośliny. Natomiast w ryzosferze rzepaku pobranego z Ostródy, liczebność hodowlanych bakterii ryzosferowych była najwyższa w fazie kwitnienia, po czym zmniejszyła się kolejno w fazie dojrzałości i wegetatywnej rośliny.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej, wyizolowano 300 izolatów bakteryjnych: po 150 izolatów z ryzosfery korzeni rzepaku uprawianego w Górsku i w Ostródzie, w tym po 50 izolatów z każdej fazy wzrostu rośliny: wegetatywnej, kwitnienia i dojrzewania. Następnie, przeprowadzono charakterystykę ich właściwości promujących wzrost roślin (PGP), w tym produkcję kwasu indolilo-3-octowego (IAA), fosforanów, deaminazy ACC, sideroforów, chitynaz, cyjanowodoru (HCN) i amoniaku. Badanie miało na celu sprawdzenie czy istnieje związek między liczebnością ryzobakterii izolowanych z różnych faz wzrostu rośliny, a ich

29.03.2024r. S. M. S. S.

właściami PGP. W ryzosferze rzepaku uprawianego w Górsku, największą populację hodowlanych ryzobakterii stwierdzono w fazie wegetatywnej rzepaku, a cztery z siedmiu badanych cech PGP, takich jak: produkcja deaminazy ACC, sideroforów, HCN i chitynaz były wytwarzane przez najwyższy procent izolatów również w fazie wegetatywnej rośliny. W przypadku ryzosfery rzepaku uprawianego w Ostródzie, najwyższą liczebność mikroorganizmów ryzosferowych odnotowano w próbach pobranych w fazie kwitnienia rzepaku i również z tej fazy wzrostu rośliny wyizolowano najwięcej szczepów zdolnych do produkcji IAA, ACC deaminazy, fosforanów, sideroforów oraz amoniaku.

W kolejnym etapie badań, ryzobakterie, które wykazywały wysokie aktywności co najmniej czterech z siedmiu badanych cech PGP zidentyfikowano i wytypowano do doświadczenia doniczkowego, w celu zbadania ich zdolności promujących wzrost rzepaku w warunkach sterylnych. Badania wazonowe w warunkach sterylnych pozwoliły wytypować szczepy najlepiej promujące wzrost roślin. Należały do nich: *Bacillus paralicheniformis* 2R5, wyizolowany z ryzosfery rzepaku w Górsku oraz *Peribacillus frigoritolerans* 2RO30 i *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 pochodzące z ryzosfery rzepaku w Ostródzie. W oparciu o doświadczenia w warunkach sterylnych, *B. paralicheniformis* 2R5, *P. frigoritolerans* 2RO30 i *P. sivasensis* 2RO45 wybrano do badań doniczkowych w niesterylnej glebie. Badania te miały na celu sprawdzenie czy izolaty będą promowały wzrost rzepaku również w obecności rodzimych mikroorganizmów glebowych. Dodatkowo w doświadczeniach doniczkowych z użyciem gleby niesterylnej, wykorzystano konsorcjum składające się z dwóch izolatów *P. frigoritolerans* 2RO30 i *P. sivasensis* 2RO45, aby sprawdzić czy konsorcjum drobnoustrojów będzie wykazywało lepsze działanie promujące niż pojedyncze szczepy. Badania wazonowe w niesterylnej glebie wykazały, że tylko pojedyncze szczepy *B. paralicheniformis* 2R5 i *P. sivasensis* 2RO45 promowały wzrost rzepaku.

Ryzobakterie promujące wzrost rzepaku: *B. paralicheniformis* 2R5 i *P. sivasensis* 2RO45 poddano analizie sekwencjonowania genomu w celu znalezienia genów odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin i biologiczną kontrolę fitopatogenów. Analiza genomu *B. paralicheniformis* 2R5 wykazała obecność genów odpowiedzialnych za biosyntezę IAA, solubilizację fosforanów, sekwestrację sideroforów i produkcję chitynaz. Natomiast, w genomie *P. sivasensis* 2RO45 znaleziono geny odpowiedzialne za biosyntezę IAA, solubilizację fosforanów, produkcję ACC deaminazy i sekwestrację sideroforów. W genomach tych szczepów zidentyfikowano również wiele biosyntetycznych klastrów genów, które kodują biologicznie czynne metabolity wtórne wykazujące działanie przeciwgrzybowe.

Ponadto, w genomie *B. paralicheniformis* 2R5 znaleziono geny związane z obiegiem azotu, takie jak *narG* oraz *nosZ*. Z tego względu, sprawdzono czy inokulacja *B. paralicheniformis* 2R5 może mieć wpływ na liczbę kopii tych genów w ryzosferze rzepaku oraz oznaczono liczbę kopii innych równie ważnych genów związanych z obiegiem azotu, takich jak *nifH*, *nirS* i *amoA*. Badania wykazały, że obecność genów *narG* i *nosZ* w genomie *B. paralicheniformis* 2R5, była zbieżna z istotnymi zmianami w liczbie kopii genów związanych z cyklem azotu w ryzosferze. Inokulacja *B. paralicheniformis* 2R5 spowodowała wzrost liczby kopii genów zarówno *narG* i *nosZ*, które występowały w genomie szczepu 2R5, jak również wzrost liczby kopii innych genów, takich jak *nifH* i *nirS*.

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu inokulacji *B. paralicheniformis* 2R5 oraz *P. sivasensis* 2RO45 na skład i różnorodność zbiorowisk bakteryjnych i grzybowych w ryzosferze rzepaku. W badaniach zaobserwowano, iż inokulacja *P. sivasensis* 2RO45 nie wpłynęła istotnie na wskaźniki alfa-bioróżnorodności. Jednakże, liniowa analiza dyskryminacyjna wykazała, że inokulacja *P. sivasensis* 2RO45 zmieniła skład taksonomiczny zbiorowisk drobnoustrojów ryzosfery rzepaku, istotnie zwiększając liczbę odczytów korzystnych dla roślin mikroorganizmów, takich jak bakterie z rodziny *Comamonadaceae* i *Vicinamibacteraceae*, rodzaju *Streptomyces* oraz grzyby z rodziny *Nectriaceae*, *Didymellaceae*, rodzaju *Exophiala* i gatunków *Cyphellophora vermispora* i *Mortierella minutissima*. Ponadto, zaobserwowano, że inokulacja szczepem *B. paralicheniformis* 2R5 początkowo zmniejszyła bogactwo gatunkowe społeczności bakteryjnych, podczas gdy po 44 dniach inokulacji wskaźnik alfa-bioróżnorodności wzrósł. Liniowa analiza dyskryminacyjna wykazała, że inokulacja *B. paralicheniformis* 2R5 zmodyfikowała skład taksonomiczny zbiorowisk bakterii i grzybów ryzosfery rzepaku, zwiększając liczbę odczytów pożytecznych dla roślin mikroorganizmów, takich jak *Nitrospira*, *Ramlibacter*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Terrimonas* oraz *Solicoccozyma*, *Schizothecium*, *Cyphellophora*, *Fusicolla*, *Humicola*.

W niniejszej pracy doktorskiej, przeanalizowano również wpływ inokulacji *P. sivasensis* 2RO45 na aktywność metaboliczną i bioróżnorodność funkcjonalną mikroorganizmów ryzosferowych rzepaku. Badania wykazały, że inokulacja szczepem *P. sivasensis* 2RO45 przyczyniła się do wzrostu ogólnej aktywności metabolicznej drobnoustrojów ryzosferowych. Ponadto, cztery źródła węgla, w tym fenole, polimery, kwasy karboksylowe i aminokwasy, były lepiej metabolizowane przez zespół mikroorganizmów ryzosfery rzepaku inokulowanej *P. sivasensis* 2RO45 niż w próbach kontrolnych. W oparciu o uzyskane profile rozkładu substratów węglowych obliczono wskaźniki różnorodności

funkcjonalnej. Badania wykazały, że inokulacja *P. sivasensis* 2RO45 spowodowała wzrost różnorodności funkcjonalnej mikrobiomu ryzosfery rzepaku mierzonej wskaźnikiem bioróżnorodności Shannona-Wienera ( $H'$ ) oraz indeksem równocенności Shannona-Wienera ( $E$ ).

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy opisują gatunki *Bacillus paralicheniformis* i *Pseudomonas sivasensis* jako ryzobakterie promujące wzrost rzepaku. *B. paralicheniformis* 2R5 i *P. sivasensis* 2RO45 promując wzrost rzepaku mogą być obiecującą alternatywą dla chemicznych fungicydów czy nawozów mineralnych. Ich potencjalna zdolność zmiany mikrobiomu poprzez zwiększenie liczby korzystnych dla roślin grup mikroorganizmów wydaje się być ważna z punktu widzenia poprawy wydajności upraw rzepaku. Dalsze badania w kierunku opracowania formułacji preparatu na bazie tych bakterii mogą przyczynić się do lepszej jakości uprawy rzepaku.